

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10036272 A**

(43) Date of publication of application: **10 . 02 . 98**

(51) Int. Cl

A61K 31/70

A61K 31/70

A61K 31/70

A61K 31/70

C07H 21/04

C12N 15/09

(21) Application number: **08196149**

(71) Applicant: **TOYAMA CHEM CO
LTD SHIOZAWA SHUNICHI**

(22) Date of filing: **25 . 07 . 96**

(72) Inventor: **SHIOZAWA SHUNICHI
TANAKA KEIICHI**

**(54) ANTAGONISTIC INHIBITOR AGAINST
TRANSCRIPTION FACTOR AP-1**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject drug which can inhibit the growth of menenchym cells and prevent and cure collagen disease by containing a double-stranded oligonucleotide which possesses high affinity at the bonding part of transcription factor AP-1 by which revelation of collagenase gene is controlled.

SOLUTION: This drug possesses a sequence identical or homologus to the part sequence at the promoter region of

collagenase gene of optional animal species and contains a double-stranded oligonucleotide of more than 8 base length involving the Ap-1 bonding part (TGAGTCA and its complementary-stranded TGACTCA) as the part. This oligonucleotide is preferable to be 12-30 base length and more preferable to be 14-24 base length. Thus, it is possible that the transcription factor AP-1 is preferentially combined with the above double-stranded oligonucleotide, the linkage of the transcription AP-1 to the promoter region of the original bonding part is antagonistically inhibited and the revelation of the collagenase gene is suppressed.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-36272

(43) 公開日 平成10年(1998)2月10日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 府内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|-------------------------------------|--------------|--------|
| A 61 K 31/70 | A E D | | A 61 K 31/70 | A E D |
| | A B C | | | A B C |
| | A B G | | | A B G |
| | A D S | | | A D S |
| C 07 H 21/04 | | | C 07 H 21/04 | Z |
| | | 審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 6 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願平8-196149

(71) 出願人 000003698

富山化学工業株式会社

東京都新宿区西新宿3丁目2番5号

(71) 出願人 596109826

塩澤 俊一

兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6

(72) 発明者 塩澤 俊一

兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6

(72) 発明者 田中 啓一

富山県富山市下新北町1-31

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(22) 出願日 平成8年(1996)7月25日

(54) 【発明の名称】 転写因子AP-1の拮抗的阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の発症に関与するコラゲナーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子AP-1の結合を拮抗的に阻害し、間葉系細胞の増殖阻害および膠原病の予防・治療に有効な薬剤を提供する。

【解決手段】 コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする転写因子AP-1の拮抗的阻害剤、間葉系細胞の増殖阻害剤および膠原病の治療・予防剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする転写因子AP-1の拮抗的阻害剤。

【請求項 2】 オリゴヌクレオチドが、12～30塩基長である請求項1の転写因子AP-1の拮抗的阻害剤。

【請求項 3】 オリゴヌクレオチドが、14～24塩基長である請求項1の転写因子AP-1の拮抗的阻害剤。

【請求項 4】 オリゴヌクレオチドが、24塩基長である請求項1の転写因子AP-1の拮抗的阻害剤。

【請求項 5】 コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする間葉系細胞増殖阻害剤。

【請求項 6】 オリゴヌクレオチドが、12～30塩基長である請求項5の間葉系細胞増殖阻害剤。

【請求項 7】 オリゴヌクレオチドが、14～24塩基長である請求項5の間葉系細胞増殖阻害剤。

【請求項 8】 オリゴヌクレオチドが、24塩基長である請求項5の間葉系細胞増殖阻害剤。

【請求項 9】 コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする膠原病治療・予防剤。

【請求項 10】 オリゴヌクレオチドが、12～30塩基長である請求項9の膠原病治療・予防剤。

【請求項 11】 オリゴヌクレオチドが、14～24塩基長である請求項9の膠原病治療・予防剤。

【請求項 12】 オリゴヌクレオチドが、24塩基長である請求項9の膠原病治療・予防剤。

【請求項 13】 膠原病が慢性関節リウマチである請求項9から12の膠原病治療・予防剤。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 この発明は、特定の塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを含有し、転写因子AP-1の拮抗的結合阻害、間葉系細胞の増殖阻害、および慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の治療・予防に有効な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 組織の炎症を主病変とする疾患群を総称する膠原病は、世界的にその病因の解明と治療が困難な難治性慢性疾患として知られている。この膠原病には、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、多発性筋炎、強皮症および全身性エリテマトーデス等が含まれている。これらの疾患は、世界的に多くの研究が進められている

が、いまだに有効な治療法が発見されていない。たとえば、慢性関節リウマチは、比較的高い罹患率を示す疾患であるにも関わらず、その治療は、経験的な域を脱していない。また、未だ寛解を導くような治療法も開発されていない。このような現状は、最先端の病因研究の成果が正しく理解されていないことに起因している。

【0003】 慢性関節リウマチは、各種の炎症性物質により関節の滑膜細胞の増殖が異常に亢進して関節が破壊されることにより発症する。今日までの治療薬の開発研究は、これらの炎症性物質の活性ならびに産生を抑制することに焦点が当てられているが、これらは対症療法であり、本質的な治療法ではない。たとえば、生体膜を構成するアラキドン酸の代謝物の中には、プロスタグランジン(PG)やロイコトリエン等の炎症性物質が多く含まれており、これらの産生を担う酵素(シクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼ等)の阻害剤あるいは細胞膜上のこれらの受容体拮抗剤が数多く開発されている。

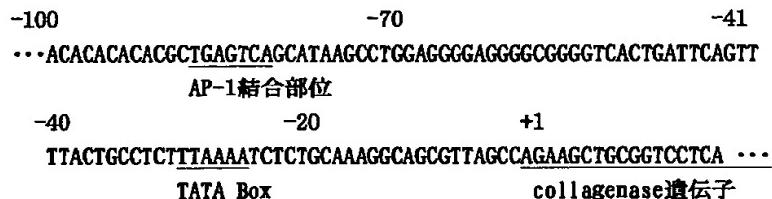
しかしながら、たとえば、シクロオキシゲナーゼを阻害し、PG産生を抑制することが知られている非ステロイド性抗炎症薬は、既に慢性関節リウマチの治療に用いられているが、関節破壊に奏功しないことが知られている。

【0004】 また、炎症性物質として各種のサイトカインが最近注目されており、実際にインターロイキン-1(IL-1)やインターロイキン-6(IL-6)、腫瘍壞死因子(TNF)等の産生阻害薬や抗サイトカイン抗体およびサイトカイン受容体に対する抗体等が世界中で研究されている。しかしながら、慢性関節リウマチの関節破壊は、多くの炎症性物質の複雑なネットワークの結果として生じると考えられることから、一つの炎症性物質の作用を打ち消したのみでは、病変の進行は抑えきれない。これは、炎症性物質の生理的な作用が相互に補完されており、一種の物質の作用を阻害しても代替的に他の炎症性物質が作用し、結果として炎症反応が進行することによると考えられる。

【0005】 一方、慢性関節リウマチの病因に関する最近の研究から、関節病変の破壊的進行には滑膜間葉系細胞が直接関与しており〔ナルズ・オブ・リウマティック・ディジーズ(Ann. Rheum. Dis.)、第51巻、第869-873頁(1992年)〕、c-fos遺伝子の過剰発現はこの滑膜間葉系細胞の増殖を引き起こし、結果的にパンヌス形成や関節破壊、骨の粗鬆化を引き起こす因子として重要であることが明らかにされている〔ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.)、第148巻、第3100-3104頁(1992年)；ジャーナル・オブ・リウマトロジー(J. Rheumatol.)、第20巻、第422-428頁(1993年)〕。すなわち、c-fos遺伝子の産物であるc-Fosタンパク質は、核内タンパク質であるc-Junと二量化し、転写因子c-Fos/AP-1複合体を構成する。c-Fos/AP-1は、遺伝子プロモーター上にある特定のAP-1結合部位に結合し、下流の遺伝子の発現を促進する。AP-1結合部位は、関節炎発症におい

て重要な役割を持つIL-1、IL-6およびTNF等のサイトカイン遺伝子のプロモーター領域並びに関節破壊を引き起こすコラゲナーゼおよびストロメライシン等のメタロプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域等に位置しており、特定の塩基配列 TGAGTCAを有している。したがって、滑膜間葉系細胞で過剰に発現しているAP-1の転写活性（AP-1のプロモーターへの結合）を拮抗的に阻害することが可能になれば、関節破壊に関与する多種の炎症性物質の発現を防ぐことができ、より病因に近づいた治療法となると考えられる。このような間葉系細胞の活性化への着目は、慢性関節リウマチのみでなく、その他の膠原病や間葉系細胞の増殖が関与する難治性疾患への治療法提供という観点からも注目される。

【0006】このようなc-fos遺伝子の発現によるc-Fosタンパクの過剰産生と間葉系細胞の活性化の知見に基づ*



上記の遺伝子のプロモーター領域はAP-1結合部位を有しており、その遺伝子の発現はc-Fos/AP-1によって調節されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第268巻、第23460-23468頁(1993年)]。一方、慢性関節リウマチ等の膠原病の関節破壊にコラゲナーゼが関与することも知られている (アリストリティス・アンド・リウマチズム [Arthritis. Rheum.、第34巻、第1085-1093頁、1991年])。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】先願発明において、AP-1結合部位であるTGAGTCAまたはTGACTCAの塩基配列を含むヌクレオチドが間葉系細胞の増殖阻害作用を有することが示されているが、より強いAP-1結合阻害効果を有し、間葉系細胞の増殖阻害および膠原病の予防・治療に有効な薬剤が求められていた。

【0009】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、コラゲナーゼ遺伝子の発現をコントロールする転写因子AP-1の結合部位に高い親和性を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを含有する新規な薬剤を提供することを目的としている。

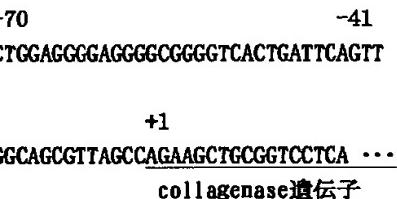
【0010】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする転写因子AP-1の拮抗的阻害剤を提供する。

【0011】また、この発明は、コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域の一部配列と同一または相同であり、TG

*く治療薬としては、遺伝子発現プロモータ領域に存在するAP-1結合部位であるTGAGTCAまたはTGACTCAからなるヌクレオチド（以下、AP-1ヌクレオチドと記載する）を含有する間葉系細胞の増殖阻害剤が知られている（特開平7-126168号公報。以下、先願発明と記載する）。この先願発明には、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAからなる2本鎖AP-1ヌクレオチドがマウスII型コラーゲン関節炎モデルにおける慢性関節炎を有意に抑制することが記載されている。

10 【0007】なお、コラゲナーゼは、コラーゲンを特異的に分解するプロテアーゼであり、コラーゲンの存在するほとんどの組織に存在する。たとえば、マウスのタイプIVコラゲナーゼをコードする遺伝子の配列は以下のとおりである。



AGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする間葉系細胞増殖阻害剤を提供する。さらにこの発明は、コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAを含む8塩基長以上の2本鎖オリゴヌクレオチドを含有することを特徴とする膠原病治療・予防剤をも提供する。

【0012】

30 【発明を実施するための形態】前記従来の技術として説明したとおり、慢性関節リウマチ等の膠原病の関節破壊にはコラゲナーゼが関与することは明らかであり、コラゲナーゼ遺伝子の発現を抑制することで関節破壊を抑えることができると考えられる。この発明は、コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域に外来性の2本鎖オリゴヌクレオチドを結合させ、これによって転写因子AP-1がプロモータ領域へ結合することを拮抗的に阻害することを特徴としている。その際に、2本鎖オリゴヌクレオチドはAP-1結合部位とその前後の配列を含むことが重要である。具体的には、任意の動物種のコラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、その一部としてAP-1結合部位 (TGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCA) を含むことを必須としている。コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域としては、たとえば、ヒト・コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域またはマウス・コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域などの一部が挙げられる。具体的には、マウス・コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部であれば、以下の配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチドである。

40 50 【0013】5'-CAC ACA CGC TGA GTC AGC ATA AGC-3'

3'-TGT GCG ACT CAG TCG TAT TCG GAC-5'

この発明の薬剤に含有される2本鎖オリゴヌクレオチドは、動物のゲノムDNAから単離したものでもよく、また公知の方法によって化学合成したものでもよい。2本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともAP-1結合部位であるTGAGTCAおよびその相補鎖TGACTCAと共に、その前後にコラゲナーゼ遺伝子の配列を含む8塩基長以上あることが必要であるが、好ましくは12~30塩基長、さらに好ましくは14~24塩基長の長さとすることができます。具体的には、上記に示したような24塩基長からなる2本鎖オリゴヌクレオチドである。また、2本鎖オリゴヌクレオチドの両端は、上記配列のように3'-あるいは5'-末端が突出していても(stickyend)よく、または平坦であっても(blunt end)よい。

【0014】この発明の薬剤は、医薬上許容される賦形剤、担体および希釈剤などの製剤助剤を適宜用いて、常法により錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤、坐剤または注射剤などの製剤とし、経口または非経口で、ヒトをはじめとする哺乳動物に投与することができる。注射剤は、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤および関節内注射剤等の剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法、すなわち2本鎖オリゴヌクレオチドを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解または懸濁乳化することによって調整される。また、2本鎖オリゴヌクレオチドをリポソームに包埋したり、あるいはカチオン性の脂質と混合して投与することもでき、この場合、より一層の効果が期待できる。また、投与方法、投与量および投与回数は、患者の年齢、体重および症状に応じて適宜選択できるが、経口投与の場合、通常成人に対して1日10μg~10mgを1回から数回に分割して投与すればよい。

【0015】

【実施例】以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。なお、以下の実施例に使用した2本鎖オリゴヌクレオチドの塩基配列およびその構造は、以下のとおりである。全ての2本鎖オリゴムクレオチドは下線で示したAP-1結合部位を含んでいる。

・対照オリゴヌクレオチド

5'-GTC TTA CCC TGA GTC AGA GGA GAA-3'

3'-AAT GGG ACT CAG TCT CCT CTT GGG-5'

・オリゴヌクレオチド1

5'-CAC ACA CGC TGA GTC AGC ATA AGC-3'

3'-TGT GCG ACT CAG TCG TAT TCG GAC-5'

・オリゴヌクレオチド2

5'-ACA CAC GCT GAG TCA GCA TAA GCC-3'

3'-TGT GTG CGA CTC AGT ATT CGG-5'

*・オリゴヌクレオチド3

5'-CAC ACA CGC TGA GTC AGC ATA AGC-3'

3'-TGT GTG TGT GCG ACT CAG TCG TAT-5'

・オリゴヌクレオチド4

5'-CGC TGA GTC AGC AT-3'

3'-ACT CAG TCG TAT TC-5'

実施例1

マウスのコラーゲン関節炎モデルに対するスクレオチドの効果を試験した。

10 【0016】DBA/1J雄性マウスの皮下にフロイントの完全アジュバント(FCA)と共に200μgのII型コラーゲンを3週間隔で2回投与し、関節炎を誘発した。初回投与の2週間後から週2回、1回5μgの対照オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド1を腹腔内に投与し、関節炎の抑制効果を調べた。なお、コントロール群(陰性対照)には、生理食塩水を同様に投与した。初回免疫後、6週に後肢関節の病理組織検査を実施した。

【0017】各検査の結果は、以下の指標に従って数値化した。

20 ・関節炎の程度

0：正常

1：滑膜肥厚と細胞浸潤

2：パンヌスによる破壊

3：軟骨・骨の明確な破壊

4：関節構造の消失または骨性癒合

・細胞浸潤の程度

0：浸潤なし

1：全視野で50個未満

2：全視野で50~200個未満

30 3：全視野で200~500個未満

4：全視野で500個以上

・関節破壊の程度

0：正常

1：関節の2/3以上が正常

2：関節の1/3以上2/3未満が正常

3：関節の1/3未満が正常

4：全関節の破壊

検査結果は、各スコアの平均値として表1に示したとおりである。この結果は、2本鎖オリゴヌクレオチドのAP

40 -1結合部位以外の配列が、関節炎抑制効果に関与することを示している。すなわち、マウスのコラーゲナーゼのプロモータ領域の塩基配列の一部に一致するオリゴヌクレオチド1は、既知の対照オリゴヌクレオチドに比べ、関節炎および関節破壊の所見で強い治癒効果を有することが確認された。

【0018】

【表1】

後肢関節の病理組織学的観察

| 群 | 匹数 | 関節炎 | 細胞浸潤 | 関節破壊 |
|----------|----|------|------|------|
| コントロール | 16 | 3.06 | 3.44 | 3.38 |
| 対照ヌクレオチド | 16 | 1.93 | 2.50 | 2.38 |
| ヌクレオチド1 | 16 | 1.38 | 1.81 | 1.06 |

【0019】実施例2

実施例1と同様にして、オリゴヌクレオチドのマウスのコラーゲン関節炎に対する効果を観察した。関節炎の評価は BjorkとKleinauの方法 [エージェンツ・アンド・アクションズ(Agents Actions)、第27巻、第319-321頁(1989年)] に準じ、四肢の腫脹の程度を初回免疫後、43日目に肉眼的に観察し、以下の炎症スコアに従って数値化した。

【0020】

1：1ヶ所または2ヶ所の関節炎

2：2ヶ所の関節炎および足蹠の軽度の発赤と腫脹

3：3ヶ所以上の関節炎と足蹠の重度の発赤と腫脹

結果は表2に炎症スコアの平均値を示したとおりである。この結果は、2本鎖オリゴヌクレオチドの両端は、平坦であっても (blunt end : オリゴヌクレオチド2)、3'-あるいは5'-末端が突出していても (sticky end : オリゴヌクレオチド1および3) 同様の関節炎抑制作用を有することを示す。さらに、2本鎖オリゴヌクレオチドの長さを14塩基としても (オリゴヌクレオチド4) *

* 4) 抑制効果が確認された。

【0021】

10 【表2】

四肢の炎症スコア

| 群 | 匹数 | 炎症スコア |
|---------|----|-------|
| コントロール | 8 | 5.1 |
| ヌクレオチド1 | 8 | 3.9 |
| ヌクレオチド2 | 8 | 3.9 |
| ヌクレオチド3 | 8 | 4.1 |
| ヌクレオチド4 | 7 | 3.3 |

20

【0022】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の発症に関与するコラゲナーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子AP-1の結合を拮抗的に阻害し、間葉系細胞の増殖阻害および膠原病の予防・治療に有効な薬剤が提供される。

【手続補正書】

【提出日】平成8年8月12日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】一方、慢性関節リウマチの病因に関する最近の研究から、関節病変の破壊的な進行には滑膜間葉系細胞が直接関与しており [アナルズ・オブ・リウマティック・ディジーズ(Ann. Rheum. Dis.)、第51巻、第869-873頁(1992年)]、c-fos遺伝子の過剰発現はこの滑膜間葉系細胞の増殖を引き起こし、結果的にパンヌス形成や関節破壊、骨の粗鬆化を引き起こす因子として重要であることが明らかにされている [ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.)、第148巻、第3100-3104頁(1992年); ジャーナル・オブ・リウマトロジー(J. Rheumatol.)、第20巻、第422-428頁(1993年)]。すなわち、c-fos遺伝子の産物であるc-Fosタンパク質は、核内タンパク質であるc-Junと二量化し、転写因子c-Fos/AP-1複合体を構成する。c-Fos/AP-1は、遺伝子プロモータ上にある特定のAP-1結合部位に結合し、下流の遺伝子の

発現を促進する。AP-1結合部位は、関節炎発症において重要な役割を持つIL-1、IL-6およびTNF等のサイトカイン遺伝子のプロモータ領域並びに関節破壊を引き起こすコラゲナーゼおよびストロメライシン等のメタロプロテアーゼ遺伝子のプロモータ領域等に位置しており、特定の塩基配列 TGAGTCAを有している。したがって、滑膜間葉系細胞で過剰に発現しているAP-1の転写活性 (AP-1のプロモータへの結合) を拮抗的に阻害することが可能になれば、関節破壊に関与する多種の炎症性物質の発現を防ぐことができ、より病因に近づいた治療法となると考えられる。このような間葉系細胞の活性化への着目は、慢性関節リウマチのみでなく、その他の膠原病や間葉系細胞の増殖が関与する難治性疾患への治療法提供という観点からも注目される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】なお、コラゲナーゼは、コラーゲンを特異的に分解するプロテアーゼであり、コラーゲンの存在す

40

50

るほとんどの組織に存在する。たとえば、マウスのタイプIVコラゲナーゼをコードする遺伝子のプロモータ領域

| | | |
|--|-----|-----|
| -100 | -70 | -41 |
| ...ACACACACACGCTGAGTCAGCATAAGCCTGGAGGGAGGGCGGGTCACTGATTCACTT | | |
| AP-1結合部位 | | |
| -40 | -20 | +1 |
| TTACTGCCTCTTAAATCTCTGCAAAGGCAGCGTTAGCCAGAAGCTGCCTGCCTCA ... | | |
| TATA Box | | |
| collagenase遺伝子 | | |

上記の遺伝子のプロモータ領域はAP-1結合部位を有しており、その遺伝子の発現はc-Fos/AP-1によって調節されている〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第268巻、第23460-23468頁(1993年)〕。一方、慢性関節リウマチ等の膠原病の関節破壊にコラゲナーゼが関与することも知られている(アリストリティス・アンド・リウマチズム[Arthritis. Rheum.、第34巻、第1085-1093頁、1991年])。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】

【発明の実施の形態】前記従来の技術として説明したとおり、慢性関節リウマチ等の膠原病の関節破壊にはコラゲナーゼが関与することは明らかであり、コラゲナーゼ遺伝子の発現を抑制することで関節破壊を抑えることができると考えられる。この発明は、コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域と同一または相同な塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを生体内に投与し、この2本鎖オリゴヌクレオチドに転写因子AP-1を優先的に結合させることによって、転写因子AP-1がその本来の結合部位であるプロモータ領域に結合することを拮抗的に阻害し、これによってコラゲナーゼの発現を抑制することを特徴としている。その際に、2本鎖オリゴヌクレオチドはAP-1結合部位とその前後の配列を含むことが重要である。具体的には、任意の動物種のコラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部配列と同一または相同であり、その一部としてAP-1結合部位(TGAGTCAおよびその相補鎖T

の配列は以下のとおりである。

GACTCA)を含むことを必須としている。コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域としては、たとえば、ヒト・コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域またはマウス・コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域などの一部が挙げられる。具体的には、マウス・コラゲナーゼ遺伝子のプロモータ領域の一部であれば、以下の配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチドである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】この発明の薬剤は、医薬上許容される賦形剤、担体および希釈剤などの製剤助剤を適宜用いて、常法により錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤、坐剤または注射剤などの製剤とし、経口または非経口で、ヒトをはじめとする哺乳動物に投与することができる。注射剤は、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤および関節内注射剤等の剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法、すなわち2本鎖オリゴヌクレオチドを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解または懸濁乳化することによって調製される。また、2本鎖オリゴヌクレオチドをリポソームに包埋したり、あるいはカチオン性の脂質と混合して投与することもでき、この場合、より一層の効果が期待できる。また、投与方法、投与量および投与回数は、患者の年齢、体重および症状に応じて適宜選択できるが、経口投与の場合、通常成人に対して1日10μg~10mgを1回から数回に分割して投与すればよい。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
C 12 N 15/09

識別記号 庁内整理番号
Z N A 9282-4B

F I
C 12 N 15/00

技術表示箇所
Z N A A